

IFW



# UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE  
United States Patent and Trademark Office  
Address: COMMISSIONER FOR PATENTS  
P.O. Box 1450  
Alexandria, Virginia 22313-1450  
www.uspto.gov

APPLICATION NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
09/230,275	01/23/2002	Mark E. Merchant	5093	4576

7590 04/07/2006

JEROLD I SCHNEIDER  
ARTER & HADDEN LLP  
1801 K STREET N.W.  
SUITE 400K  
WASHINGTON, DC 20006-1301



EXAMINER

GITOMER, RALPH J

ART UNIT PAPER NUMBER

1655

DATE MAILED: 04/07/2006

Please find below and/or attached an Office communication concerning this application or proceeding.

<b>Office Action Summary</b>	<b>Application No.</b>		<b>Applicant(s)</b>	
	09/230,275		MERCHANT ET AL.	
	<b>Examiner</b>		<b>Art Unit</b>	
	Ralph Gitomer		1655	

**-- The MAILING DATE of this communication appears on the cover sheet with the correspondence address --**

**Period for Reply**

A SHORTENED STATUTORY PERIOD FOR REPLY IS SET TO EXPIRE 3 MONTH(S) OR THIRTY (30) DAYS, WHICHEVER IS LONGER, FROM THE MAILING DATE OF THIS COMMUNICATION.

- Extensions of time may be available under the provisions of 37 CFR 1.136(a). In no event, however, may a reply be timely filed after SIX (6) MONTHS from the mailing date of this communication.
- If NO period for reply is specified above, the maximum statutory period will apply and will expire SIX (6) MONTHS from the mailing date of this communication.
- Failure to reply within the set or extended period for reply will, by statute, cause the application to become ABANDONED (35 U.S.C. § 133). Any reply received by the Office later than three months after the mailing date of this communication, even if timely filed, may reduce any earned patent term adjustment. See 37 CFR 1.704(b).

**Status**

- 1) ☒ Responsive to communication(s) filed on 04 March 2002.
- 2a) ☐ This action is **FINAL**.                      2b) ☒ This action is non-final.
- 3) ☐ Since this application is in condition for allowance except for formal matters, prosecution as to the merits is closed in accordance with the practice under *Ex parte Quayle*, 1935 C.D. 11, 453 O.G. 213.

**Disposition of Claims**

- 4) ☒ Claim(s) 1-20 is/are pending in the application.
- 4a) Of the above claim(s) \_\_\_\_\_ is/are withdrawn from consideration.
- 5) ☐ Claim(s) \_\_\_\_\_ is/are allowed.
- 6) ☐ Claim(s) \_\_\_\_\_ is/are rejected.
- 7) ☐ Claim(s) \_\_\_\_\_ is/are objected to.
- 8) ☒ Claim(s) 1-20 are subject to restriction and/or election requirement.

**Application Papers**

- 9) ☐ The specification is objected to by the Examiner.
- 10) ☐ The drawing(s) filed on \_\_\_\_\_ is/are: a) ☐ accepted or b) ☐ objected to by the Examiner.  
Applicant may not request that any objection to the drawing(s) be held in abeyance. See 37 CFR 1.85(a).  
Replacement drawing sheet(s) including the correction is required if the drawing(s) is objected to. See 37 CFR 1.121(d).
- 11) ☐ The oath or declaration is objected to by the Examiner. Note the attached Office Action or form PTO-152.

**Priority under 35 U.S.C. § 119**

- 12) ☐ Acknowledgment is made of a claim for foreign priority under 35 U.S.C. § 119(a)-(d) or (f).
- a) ☐ All    b) ☐ Some \*    c) ☐ None of:
1. ☐ Certified copies of the priority documents have been received.
2. ☐ Certified copies of the priority documents have been received in Application No. \_\_\_\_\_.
3. ☐ Copies of the certified copies of the priority documents have been received in this National Stage application from the International Bureau (PCT Rule 17.2(a)).
- \* See the attached detailed Office action for a list of the certified copies not received.

**Attachment(s)**

- |                                                                                                                        |                                                                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 1) <input checked="" type="checkbox"/> Notice of References Cited (PTO-892)                                            | 4) <input type="checkbox"/> Interview Summary (PTO-413)<br>Paper No(s)/Mail Date. _____ |
| 2) <input type="checkbox"/> Notice of Draftsperson's Patent Drawing Review (PTO-948)                                   | 5) <input type="checkbox"/> Notice of Informal Patent Application (PTO-152)             |
| 3) <input type="checkbox"/> Information Disclosure Statement(s) (PTO-1449 or PTO/SB/08)<br>Paper No(s)/Mail Date _____ | 6) <input type="checkbox"/> Other: _____                                                |

Please update the specification regarding the claimed priority to 7/24/1996. No abstract is found in the file, an abstract on a separate page is required.

***Election/Restrictions***

Restriction is required under 35 U.S.C. 121 and 372.

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

In accordance with 37 CFR 1.499, applicant is required, in reply to this action, to elect a single invention to which the claims must be restricted.

Group I, claim(s) 1-10, drawn to a reagent composition.

Group II, claim(s) 11-20, drawn to a method for analysis of cholesterol contents.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The method requires staining after separating cholesterol components. The reagent composition of Group I includes no stains or separating.

Applicant is advised that the reply to this requirement to be complete must include (i) an election of a species or invention to be examined even though the requirement be traversed (37 CFR 1.143) and (ii) identification of the claims encompassing the elected invention.

The election of an invention or species may be made with or without traverse. To reserve a right to petition, the election must be made with traverse. If the reply does not distinctly and specifically point out supposed errors in the restriction requirement, the election shall be treated as an election without traverse.

Art Unit: 1655

Should applicant traverse on the ground that the inventions or species are not patentably distinct, applicant should submit evidence or identify such evidence now of record showing the inventions or species to be obvious variants or clearly admit on the record that this is the case. In either instance, if the examiner finds one of the inventions unpatentable over the prior art, the evidence or admission may be used in a rejection under 35 U.S.C.103(a) of the other invention.

Applicant is reminded that upon the cancellation of claims to a non-elected invention, the inventorship must be amended in compliance with 37 CFR 1.48(b) if one or more of the currently named inventors is no longer an inventor of at least one claim remaining in the application. Any amendment of inventorship must be accompanied by a request under 37 CFR 1.48(b) and by the fee required under 37 CFR 1.17(i).

The claims are directed to a reagent composition containing cholesterol dehydrogenase from *Nocardia*, cholesterol esterase, NADH, buffer (tricine). And a method for determining cholesterol on an electrophoretic plate by separating the components and staining them. These Groups are not novel and the following references are cited accordingly.

Akiba (4,892,816) entitled "Method for the Determination of Cholesterol" teaches in the abstract determining cholesterol with cholesterol dehydrogenase and NADP. In column 3 lines 19, the cholesterol dehydrogenase is produce by Nocardia sp. In column 4, lines 47-54, cholesterol esterase is used in addition to cholesterol dehydrogenase and a substance which reacts with formed NADH or NADPH to produce a colored compound, and a buffer. In column 5 first paragraph, various stains are discussed including tetrazolium salts. See claim 13.

Aufenanger (5,385,828) entitled "Method for Determining the Relative Amounts of All Cholesterol Containing Lipoproteins in Body Fluids" teaches in the abstract, a quantitative determination of cholesterol fractions after electrophoretic separation with cholesterol esterase and cholesterol dehydrogenase with other components. In column 4 lines 18-25, tetrazolium color indicators are taught.

Amano Parm (JP 58-89183) entitled "NAD(P) Dependent Cholesterol Dehydrogenase Preparation" teaches in the abstract, cholesterol dehydrogenase from Nocardia.

Nippon Chemiphar (JP 58-210000) entitled "Measuring Lipoprotein Cholesterol Level by Subjecting to Electrophoresis Then Adding Colouring Agent Containing Cholesterol Esterase and Dehydrogenase" teaches in the abstract, details of the coloring agent.

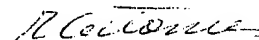
The prior art made of record and not relied upon is considered pertinent to applicant's disclosure.

Golias (4,147,606) teaches determining lipoproteins.

Any inquiry concerning this communication or earlier communications from the examiner should be directed to Ralph Gitomer whose telephone number is (571) 272-0916. The examiner can normally be reached on Monday - Friday.

If attempts to reach the examiner by telephone are unsuccessful, the examiner's supervisor, Terry McKelvey can be reached on (571) 272-0775. The fax phone number for the organization where this application or proceeding is assigned is 571-273-8300.

Information regarding the status of an application may be obtained from the Patent Application Information Retrieval (PAIR) system. Status information for published applications may be obtained from either Private PAIR or Public PAIR. Status information for unpublished applications is available through Private PAIR only. For more information about the PAIR system, see <http://pair-direct.uspto.gov>. Should you have questions on access to the Private PAIR system, contact the Electronic Business Center (EBC) at 866-217-9197 (toll-free).



Ralph Gitomer  
Primary Examiner  
Art Unit 1655

RALPH GITOMER  
PRIMARY EXAMINER  
GROUP 1206

<b>Notice of References Cited</b>	Application/Control No. 09/230,275		Applicant(s)/Patent Under Reexamination MERCHANT ET AL.	
	Examiner Ralph Gitomer		Art Unit 1655	Page 1 of 1

**U.S. PATENT DOCUMENTS**

*		Document Number Country Code-Number-Kind Code	Date MM-YYYY	Name	Classification
*	A	US-4,892,816	01-1990	Akiba et al.	435/11
*	B	US-5,385,828	01-1995	Aufenanger, Johannes	435/11
*	C	US-4,147,606	04-1979	Golias, Tipton L.	204/546
	D	US-			
	E	US-			
	F	US-			
	G	US-			
	H	US-			
	I	US-			
	J	US-			
	K	US-			
	L	US-			
	M	US-			

**FOREIGN PATENT DOCUMENTS**

*		Document Number Country Code-Number-Kind Code	Date MM-YYYY	Country	Name	Classification
	N	JP 58-89183	05-1983	Japan	Amano Parm	
	O	JP 58-210000	12-1983	Japan	Nippon Chemiphar	
	P					
	Q					
	R					
	S					
	T					

**NON-PATENT DOCUMENTS**

*		Include as applicable: Author, Title Date, Publisher, Edition or Volume, Pertinent Pages)
	U	
	V	
	W	
	X	

\*A copy of this reference is not being furnished with this Office action. (See MPEP § 707.05(a).)  
Dates in MM-YYYY format are publication dates. Classifications may be US or foreign.

1/34/8 (Item 4 from file: 351)

003706377

WPI Acc No: 1983-702559/198327

**NAD(p) dependent cholesterol dehydrogenase prepn. - by  
cultivating Nocardia Alcaligenes or Proteus microorganism aerobically and  
recovering prod.**

Patent Assignee: AMANO PHARM KK (AMAN )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 58089183	A	19830527				198327 B
JP 90018064	B	19900424	JP 81186183	A	19811119	199020

Priority Applications (No Type Date): JP 81186183 A 19811119

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 58089183	A		9		

Abstract (Basic): JP 58089183 A

<http://www.dialogweb.com/cgi/dwclient?req=1143736480348>

3/30/2006

Prodn. of NAD(P) dependent cholesterol dehydrogenase (NAD(P)-CDH) comprises cultivating a microorganism of Nocardia (specific: Nocardia sp.No.Ch 2-1, FERM-P 6217), Alcaligenes (Alc.sp.No.4, FERM-P 6216) or Proteus (Proteus vulgaris IAM 1025) which grows under aerobic conditions, and recovering NAD(P)-CDH from the culture broth.

The microorganism may be incubated in a medium contg. nitrogen source (peptone, yeast extract, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), carbon source (glucose, glycerol) and mineral. Addn. of cholesterol to the medium increases the yield of NAD(P)-CDH. In recovering NAD(P)-CDH, the cultured broth or organism extract is treated by salting-out or pptn. with Me<sub>2</sub>CO and EtOH. The resulting crude enzyme may be purified by ion-exchange chromatography or molecular sieve chromatography.

NAD(P)-CDH is useful as a reagent used in quantitative analysis of cholesterol. For example, the reagent consists of 0.1-10 unit NAD(P)-CDH, 10-100 mM NAD(P), less than 1.0% Triton 100, and 0.1-10 unit cholesterol esterase.

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Additional): C12N-009/04; C12R-001/05

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2006 Thomson Derwent. All rights reserved.

© 2006 Dialog, a Thomson business



SOURCE: (C) WPI / DERWENT

XP 2044527

AN : 83-702559 [27]

MC : B04-B02C2 B12-K04 D05-C03

PN : JP58089183 A 830527 DW8327 009pp  
- JP2018064B B 900424 DW9020 000pp

PR : JP810186183 811119

PA : (AMAN ) AMANO PHARM KK

DC : B04 D16

IC : C12N9/04 ;C12R1/05

TI : NAD(p) dependent cholesterol dehydrogenase prepn. - by cultivating Nocardia Alcaligenes or Proteus microorganism aerobically and recovering prod.

AB : J58089183 Prodn. of NAD(P) dependent cholesterol dehydrogenase (NAD(P)-CDH) comprises cultivating a microorganism of Nocardia (specific: Nocardia sp.No.Ch 2-1, FERM-P 6217), Alcaligenes (Alc.sp.No.4, FERM-P 6216) or Proteus (Proteus vulgaris IAM 1025) which grows under aerobic conditions, and recovering NAD(P)-CDH from the culture broth.

- The microorganism may be incubated in a medium contg. nitrogen source (peptone, yeast extract, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), carbon source (glucose, glycerol) and mineral. Addn. of cholesterol to the medium increases the yield of NAD(P)-CDH. In recovering NAD(P)-CDH, the cultured broth or organism extract is treated by salting-out or pptn. with Me<sub>2</sub>CO and EtOH. The resulting crude enzyme may be purified by ion-exchange chromatography or molecular sieve chromatography.
- NAD(P)-CDH is useful as a reagent used in quantitative analysis of cholesterol. For example, the reagent consists of 0.1-10 unit NAD(P)-CDH, 10-100 mM NAD(P), less than 1.0% Triton 100, and 0.1-10 unit cholesterol esterase.

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—89183

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和58年(1983)5月27日

C 12 N 9/04

7236—4B

// (C 12 N 9/04

C 12 R 1/365)

(C 12 N 9/04

C 12 R 1/05 )

(C 12 N 9/04

C 12 R 1/37 )

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 9 頁)

⑮ NAD (P) 依存性コレステロール脱水素酵素の製造法

⑯ 発明者 秋葉哲典

岐阜県可児郡可児町愛岐ヶ丘1—165

⑰ 特 願 昭56—186183

⑰ 出 願 人 天野製薬株式会社

⑱ 出 願 昭56(1981)11月19日

名古屋市中区錦一丁目2番7号

明 細 書

1. 発明の名称

NAD (P) 依存性コレステロール脱水素酵素の製造法

2. 特許請求の範囲

1. 好氣的条件下で生育する微生物を培養し培養物からNAD (P) 依存性コレステロール脱水素酵素を採取することを特徴とするNAD (P) 依存性コレステロール脱水素酵素の製造法。

2. 好氣的条件下で生育する微生物がノカルジア属、アルカリゲネス属、プロテウス属のうちのいずれかに属する菌株である特許請求の範囲第1項記載のNAD (P) 依存性コレステロール脱水素酵素の製造法。

3. ノカルジア属に属する菌株がノカルジア sp. № Ch 2—1 (Nocardia sp. № Ch 2—1) FERM—P № 6217 である特許請求の範囲第2項記載のNAD (P) 依存性コレステロール脱水素酵素の製造法。

4. アルカリゲネス属に属する菌株がアルカリ

ゲネス sp. № 4 (Alcaligenes sp. № 4) FERM—P № 6216 である特許請求の範囲第2項記載のNAD (P) 依存性コレステロール脱水素酵素の製造法。

5. プロテウス属に属する菌株がプロテウス・ブルガリス IAM1025 (Proteus vulgaris IAM1025) である特許請求の範囲第2項記載のNAD (P) 依存性コレステロール脱水素酵素の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、NAD (P) 依存性コレステロール脱水素酵素 (Cholesterol dehydrogenase: 以下「NAD (P)—CDH」と略す) に関する。さらに詳しく説明すると、微生物を好氣的条件下で培養し、その菌体もしくは培養液からNAD (P)—CDHを採取する方法に関する。

本発明方法により得られたNAD (P)—CDHは、コレステロールの定量法およびコレステロールの定量用試薬として有用である。ここでいうNAD (P)—CDHとは、補酵素としてNAD (ニコチン

アミドアデニン、ジヌクレオチド)、NADP (ニコチンアミドアデニン、ジヌクレオチドリッ酸)を要求し、電子供与体(コレステロール)から水素をうばい、電子受容体(NAD又はNADP)に付加する反応を触媒する酵素をいう。従来好気性微生物が、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールデヒドラターゼを生産することは既に知られている。また、ノカルジア・エリスロポリスがコレステロールの酸化を触媒する酵素を生産するとの報告(Ann. Clin. Biochem., 10巻、79項、1973年)がある。この酵素の場合は、NAD(P)への依存性は認められない。また、マイコバクテリウム・コレステリカム(J. Biol. Chem., 206巻、511項、1953年)、プレバクテリウム・ステロリカム(特公昭48-1190)についても同様のことがいえる。さらには、絶対嫌気性微生物である、オイバクテリウム sp. ATCC21408がNAD(P)-CDHを生産するとの報告(特開昭53-56090)もあるが、酵素学的性質等の記載はほとんどなされていないばかり

本発明者等は、上記反応に適した酵素すなわち、コレステロールに特異性が高く、NAD(P)依存性である脱水素酵素を広く自然界に求めたところ、意外にも好氣的条件下に生育する微生物が、著量のNAD(P)-CDHを生産することを見出した。その中で、特に優れた菌株として、ノカルジア sp. Na Ch2-1(Nocardia sp. Na Ch2-1)、アルカリゲネス sp. Na 4(Alcaligenes sp. Na 4)、およびプロテウス・ブルガリス IAM1025 Proteus vulgaris IAM1025 が例示される。

次にノカルジア sp. Na Ch2-1およびアルカリゲネス sp. Na 4 の菌学的性質を以下に述べる。

(1) ノカルジア sp. Na Ch2-1(Nocardia sp. Na Ch2-1)の菌学的性質

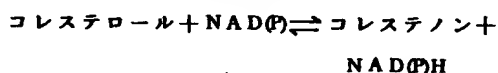
(A) 形態的性質

- 1) 細胞の形および大きさ：培養初期菌糸状に生育し分岐を生じる。その後、不規則な分断が生じ細胞は桿菌状となる。大きさは $0.8 \sim 1.0 \mu \times 1.5 \sim 4.0 \mu$ 位である。気菌糸を形成せず胞子のう

か、NAD(P)依存性の記載があるにもかかわらず、NAD(P)の存在なしにも反応が進行する例が記載されている。したがってこの酵素は、本発明でいうところのNAD(P)依存性脱水素酵素とはいえない。

従来酵素によるコレステロールの定量は、コレステロールオキシダーゼを使用する方法が広く用いられているが、発色系に導くためにパーオキシダーゼ等が必要であり、操作が複雑である。しかも血中のビリルビン、アスコルビン酸等により影響をうけ、これにより誤差が生じやすいという欠点を有している。

コレステロールの定量において、NAD(P)の存在なしには反応が進行しないNAD(P)-CDHを用い、下記反応式に示される反応により生ずるNAD(P)Hを直接光度計で測定できれば、操作が簡単であり、前記のコレステロールオキシダーゼを用いる方法の種々の問題も解決される。



胞子も形成しない。

- 2) グラム染色性：陽性
- 3) 抗酸性：陽性
- 4) 運動性：無し

(B) 化学的組成分析

細胞壁中に meso-ジアノビメリン酸、アラビノース、ガラクトースが含まれ、<sup>γ</sup>-ジアミノビメリン酸、グリシンは含まない。

(C) 各培地における生育状態

- 1) 肉汁寒天平板培地：30℃で4日培養後、直径0.5～1.0mmの円形コロニーを形成する。周辺は全縁もしくは波状である。表面は平滑で半球状であり、中心部が凸状に隆起する場合もある。色調は薄いクリーム色で不透明である。培地中に色素は出さない。
- 2) シュークロース硝酸塩寒天培地：生育中程度で集落の色は白色ないし薄クリーム色である。水溶性色素は出さない。
- 3) グルコース、アスパラギン寒天培地

生育中程度で集落の色はクリーム色である。水溶性色素は出さない。

4) グリセリン、アスパラギン寒天培地

生育中程度で集落の色は白色ないし薄クリーム色である。水溶性色素は出さない。

5) スターチ無機塩寒天培地

生育中程度で集落の色は白色ないし薄クリーム色である。水溶性色素は出さない。

6) チロシン寒天培地

生育中程度で集落の色は白色ないし薄クリーム色である。水溶性色素は出さない。

7) 栄養寒天培地

生育良好で集落の色はクリーム色である。水溶性色素は出さない。

8) イースト麦芽寒天培地

生育良好で集落の色はクリーム色である。水溶性色素は出さない。

9) オートミール寒天培地

生育中程度で集落の色は白色ないし薄クリーム色である。水溶性色素は出さない。

て陽性

16) ペニシリン耐性試験：耐性

17) 酸素に対する態度：好気性

18) 無機窒素源の利用：アンモニウム塩、硝酸塩共に利用する。

19)  $\text{NaCl}$  生育範囲：0～6%で生育する。7%で生育しない。

20) 各種炭素源の同化性（ブドウ糖、ゴドリーブ寒天培地）

D-グルコース、D-フラクトース、マンノース、グリセリン、トレハロースを同化する。 $\text{L}$ -アラビノース、D-キシロース、サッカロース、イノシット、 $\text{L}$ -ラムノース、ラフィノース、D-ガラクトース、D-マンニット、マルトース、ソルビットを同化しない。

21) 各種糖から酸の生成

D-グルコース、マンノース、D-フラクトース、トレハロース、グリセリンから酸を生成する。 $\text{L}$ -アラビノース、D-キシロース、D-ガラクトース、

(D) 生理的性質

1) 生育温度：15℃～43℃で生育する。10℃、45℃で生育しない。最適温度は30～35℃である。

2) 硝酸塩還元性：陽性

3) カタラーゼ：陽性

4) オキシダーゼ：陰性

5) ウレアーゼ：陽性

6) デンプン加水分解：陰性

7) ゼラチン液化：陰性

8) チロシン加水分解：陰性

9) カゼイン加水分解：陰性

10) キサンチン加水分解：陰性

11) DNAの分解：陰性

12) リトマスミルク：アルカリ性、ペプトン化、凝固共にしない。

13) メラニン様色素の生成：無し

14) エスクリン加水分解：陽性

15) Tween 20、40、60、80加水分解：すべ

ス、D-キシロース、D-ガラクトース、マルトース、サッカロース、ラクトース、D-ソルビット、D-マンニット、イノシット、デンプンから酸を生成しない。

以上の菌学的性質を Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第8版を参考に検討した結果、細胞壁中に meso-ジオミノピメリン酸、アラビノース、ガラクトースを含み、 $\text{L}$ -ジオミノピメリン酸、グリシンが含まれないこと、好気性で菌糸状によく生育し、後に分断して菌状となること、抗酸性であること、胞子のう胞子および気菌糸を着生しないこと等から本菌は *Nocardia* に属する菌である。

よって本菌は、本発明者らがノカルジア sp. No Ch2-1 (*Nocardia* sp. No Ch2-1) と命名し、工業技術院微生物工業技術研究所に菌寄第6217号 (FERM-PN6217) とて寄託されている。

(2) アルカリゲネス sp. No 4 (*Alcaligenes* sp. No 4) の菌学的性質

(A) 形 態

- 1) 細胞の形および大きさ：0.4～0.6 $\mu$ ×  
0.8～1.2 $\mu$ の 菌である。
- 2) 細胞の多形性の有無：多形性は認められ  
ない。
- 3) 運動性の有無：周鞭毛を有し運動する。
- 4) 胞子の有無：胞子は形成しない。
- 5) グラム染色性：陰性
- 6) 抗酸性：陰性

(B) 各培地における生育状態

1) 肉汁寒天平面培養

円形ローニーで表面は平滑、半レンズ  
状の隆起、全縁状で薄クリーム色、半  
透明、光沢あり

2) 肉汁寒天斜面培養

生育中程度、糸状に生育、薄クリーム色  
で半透明

3) 肉汁液体培養

菌膜をつくらない、やや濁り沈 も少  
しある。

- 13) カタラーゼ：陽性
- 14) 生育範囲 PH：PH 5.0～10.0 で生育す  
る。温度：5℃～37℃で生育する。  
42℃で生育しない。
- 15) 酸素に対する態度：好気性
- 16) OF テスト (Hugh-Leifson 法)：フラ  
クトースから好氣的に酸を生成する。
- 17) 糖類から酸およびガスの生成の有無  
Ayers, Rupp and Johnson 培地でフラ  
クトースとグリセリンから酸を生成す  
るかガスは生成しない。  
アラビノース、キシロース、グルコー  
ス、マンノース、ガラクトース、麦芽  
糖、シロ糖、乳糖、トレハロース、ソ  
ルビット、マンニット、イノシット、  
デンプンからは酸もガスも生成しない。
- 18) 独立栄養的生育：水素ガス、炭酸ガス、  
酸素ガスを含有する気体中で生育しな  
い。
- 19) Tween 80 の分解性：陽性

- 4) 肉汁ゼラチン穿刺培養：ゼラチンは液化  
しない。
- 5) リトマスミルク培養：アルカリ性になる  
がペプトン化しない、凝固しない。

(C) 生理的性質

- 1) 硝酸塩の還元：陽性
- 2) 脱窒反応：陰性
- 3) MR テスト：陰性
- 4) VR テスト：陰性
- 5) インドールの生成：陰性
- 6) 硫化水素の生成：弱陽性
- 7) デンプン加水分解：陰性
- 8) クエン酸塩の利用：Koser の培地と  
Christensen の培地で共に利用する。
- 9) 無機窒素源の利用：硝酸塩およびアンモ  
ニウム塩を利用する。
- 10) 色素の生成：水溶性色素を生成しない。
- 11) ウレアーゼ：陽性
- 12) オキシダーゼ：陽性

- 20) 質化性：D-フラクトース、<sup>L</sup>-フェニ  
ルアラニン、レブリン酸カルシウム、  
<sup>L</sup>-スレオニン<sup>を質化する</sup>。マンノー  
ス、マルトース、マンニット、ベタイ  
ンを質化しない。

以上の菌学的諸性質から Bergey's manual of  
Determinative Bacteriology (第8版)の記載  
に照合して検討すると短桿菌で周鞭毛により運  
動すること、グラム陰性、好気性であること、栄  
養要求性はなく、アンモニウム塩、硝酸塩を利用  
すること、カゼインおよびゼラチンを分解しない  
こと、オキシダーゼ陽性であること等から  
Alcaligenes 属に分類される。

種については、~~文献①②③を参考に検討したとモ~~  
~~A. paradoxus, A. ruhlandii,~~  
~~A. parvulus, A. parvulus, A. ruhlandii~~  
を *Alcaligenes eutrophus* <sup>(A. lotus)</sup> および <sup>(A. faecalis)</sup> ~~A. lotus~~ とは主に独立栄養的生育の点で異  
なる。また ~~A. eutrophus~~ とは主に 42℃における生  
育、D-フラクトースの質化性で、*A. agvarinus*  
とは、主にデンプンの分解性、マルトースの質化  
性で、*A. pacificus* とは、主にスレオニン、ベ

タインの質化性で、*A. cupidus* とは、主にオキシダーゼおよびマンニット、マンノースの質化性で、*A. venustus* とは、主にレブリン酸塩、スレオニン、ベタインの質化性で、*A. aestus* とは、主にマンニット、スレオニン、フェニルアラニンの質化性で異なる。よって本菌をアルカリゲネス *sp.* №4 (*Alcaligenes sp.* №4) と命名し工業技術院微生物工業技術研究所に菌寄第6216号 (FERM-P №6216) として寄託されている。

次にこれらの菌を用いて NAD(P)-CDH を製造する方法について詳述する。これらの菌はいずれも構成的に NAD(P)-CDH を生産する能力を有し、通常のペプトン、酵母エキス、又は硫酸アンモニウム等のチッソ源及びグルコース、グリセロール等の炭素源、その他無機塩等を含有する培地でも NAD(P)-CDH を生産するが、コレステロールを培地に添加することによりさらに多量に NAD(P)-CDH を生産する。この際コレステロールの添加は、培養開始時あるいは途中からのいずれでもよい。また、その他培養条件に関しては、

通常行なわれる範囲で実施できる。これらの菌により生産された NAD(P)-CDH は、菌体のみならず、培養液中にも蓄積され、その何れからでも酵素を回収することができる。これらの培養液又は菌体抽出液を硫酸アンモニウム等による塩析又は、アセトン、エタノール等の溶剤沈澱して得た粗酵素は、そのままコレステロールの定量に使用するか、あるいは更に精製して使用することもできる。例えば精製については、イオン交換クロストグラフィー、分子篩クロストグラフィー等公知の方法により可能である。

ここで得られる NAD(P)-CDH は、コレステロール含有物質中のコレステロール定量等に有利に使用できる。

本発明に使用する NAD(P)-CDH の活性測定法を以下に示す。

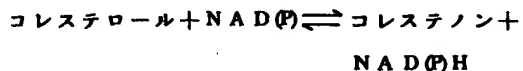
NAD(P)-CDH の酵素活性は、コレステロールと NAD(P) を基質として反応した場合の NAD(P)H の生成量を、340nm における吸光度の増加として、分光光度計で測定し算出する。すなわち、

0.1 M トリス・塩酸緩衝液 (PH 8.6) 2.65 ml、28 mM NAD 溶液 0.1 ml、(8% トリトン X-100 溶液 0.15 ml)、1% コレステロール溶液 0.05 ml 及び NAD(P)-CDH 水溶液 0.05 ml を混合し、30°C で反応させ、反応開始後1分間の 340nm における吸光度の増加を測定する。

対照として上記組成でコレステロールの代りに水を用い同様の操作を行ない、対照液の 340nm における吸光度の増加を試験液のそれから差し引く。得られた値から NAD(P)H の生成量を求め、これより試料中の NAD(P)-CDH 活性を算出する。

酵素活性の表示は、PH 8.6、30°C の条件下で1分間に 1  $\mu$  mole の NAD(P)H を生成する酵素を1単位とした。

次に本発明に使用する NAD(P)-CDH の作用を示す。



本発明における NAD(P)-CDH は全てこの反

応を触媒する。

以下に本発明に使用する NAD(P)-CDH の一般的性質をノカルジア *sp.* № Ch2-1 (*Nocardia sp.* № Ch2-1) FERM-P6217 およびアルカリゲネス *sp.* №4 (*Alcaligenes sp.* №4) FERM-P6216 の生産するものについて示す。

(1) ノカルジア *sp.* № Ch2-1 (*Nocardia sp.* № Ch2-1) FERM-P6217 の生産する NAD(P)-CDH

1) 至適 PH

第1図に 30°C における PH と活性の関係を示した。

2) PH 安定性

第2図に 37°C における PH と安定性の関係を示した。

3) 至適温度

第3図に PH 8.6 における温度と活性の関係を示した。

4) 熱安定性

第4図に PH 7.0 における温度と安定性の

関係を示した。

#### 5) 基質特異性

本素は、3β位に水酸基をもつステロイドに反応し、コレステロールを100とするとステグマステロール35、β-シトステロール25、その他デヒドロエピアンドロステロン、エルゴステロール等にわずかに作用する。

#### 6) 補素

NADを要求する。

### (2) アルカリゲネス sp. No. 4 (Alcaligenes sp. No. 4) FERM-P6216の生産するNAD(P)-CDH

#### 1) 至適PH

第5図に30℃におけるPHと活性の関係を示した。

#### 2) PH安定性

第6図に37℃におけるPHと安定性の関係を示した。

#### 3) 至適温度

で測定する。また必要に応じて、生成したNAD(P)Hの水素をフェナジンメソサルフェート(PMS)、ジアフラーゼ等により、ホルマジン色素等の発色系に導くことも可能である。さらに、反応系にコレステロールエステラーゼ、界面活性剤及び、安定化剤等の添加も可能である。反応時のPH<sup>11.6</sup><sub>6-8</sub>〜10の範囲で実施できるが、優れているPH範囲は7〜9である。

次にNAD(P)-CDHによるコレステロール定量用試薬の量的組成についての1例を述べれば、反応系3ml当り、NAD(P)-CDH 0.1〜10単位、NAD(P)-10〜100mM、トリトンX-100 1.0%以下、コレステロールエステラーゼ(ベーリンガー社製) 0.1〜10単位が有利である。しかし本発明はこれらの量的組成に限定されるものではない。本発明の測定法における特別な利点は生成するNAD(P)Hを直接測定できることであり、また完全に定量できることである。

次に試験例及び実施例につき述べる。

#### 試験例

第7図にPH 8.6における温度と活性の関係を示した。

#### 4) 熱安定性

第8図にPH 7.0における温度と安定性の関係を示した。

#### 5) 基質特異性

本素は3β位に水酸基をもつステロイドに反応し、コレステロールを100とするとβ-シトステロール36、ステグマステロール20、その他、デヒドロエピアンドロステロン、エルゴステロール等にわずかに作用する。

#### 6) 補素

NADを要求する。

次に本発明のNAD(P)-CDHを使用したコレステロールの定量について詳述する。

コレステロールを定量する場合、実際には緩衝液、NAD(P)、基質(血清、コレステロール等)及び、NAD(P)-CDHを混合し、一定時間反応し、生成するNAD(P)Hの増加を吸光度340nm

本発明における菌株3種につき、コレステロール5g/l、肉エキス5g/l、酵母エキス0.2g/l、少量の消泡剤の組成よりなる培地(PH 7.2) 100mlを入れた500ml容坂ロフラスコに植菌し、30℃で40時間振盪培養した。培養液50mlを遠心分離(8000rpm 10分間)により集菌し、0.1Mリン酸緩衝液PH 7.0、50mlで洗浄した。

次に同じ緩衝液50mlに菌体を懸濁し、超音波にて菌体を破碎した。この破碎液を遠心分離(10000rpm、10分間)し、清澄液を得た。得られた清澄液のNAD(P)-CDH活性を測定し次の結果を得た。

菌 株	培養液100ml当の活性
<i>Nocardia</i> sp. N <sub>2</sub> Ch2-1 FERM-PN6217	5.4 単位
<i>Alcaligenes</i> sp. N <sub>2</sub> 4 FERM-PN6216	2.3 単位
<i>Proteus vulgaris</i> IAM1025	1.1 単位

## 実施例1

*Nocardia* sp. Ch2-1 FERM-PN6217 をグルコース 5 g/l、肉エキス 5 g/l、酵母エキス 0.2 g/l、少量の消泡剤の組成よりなる培地 (PH 7.2)、200 ml を入れた 500 ml 容坂ロフラスコに接種し、30°C で 24 時間振盪培養する。この種培養液をコレステロール 5 g/l、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g/l、消泡剤 0.5 g/l の組成よりなる培地 (PH 7.2) 20 l を入れた 30 l 容ジャーファーメンターに接種し、30°C で通気、攪拌 (0.5 v/v/min、200 rpm) しながら 40 時間培養した。培養液を遠心分離し、得られた菌体を 0.1 M リン酸緩衝液 PH 7.0 に懸濁し、ガラスゼーズにより菌体を破砕した。この菌体破砕液を遠心分離 (1000 rpm、10 分間) し、清澄な菌体抽出液を得た。得られた清澄液に硫酸アンモニウムを 35 % 飽和になるように加え酵素を沈澱せしめた。沈澱を遠心分離 (8000 rpm、10 分間) で集め、20 mM リン酸緩衝液 PH 7.0、100 ml に溶かし、セロファンチューブで、20 mM リン酸緩衝液 PH 7.0 に対して 24 時間透析した。

次に得られた透析液を 20 mM リン酸緩衝液 PH 7.0 で平衡化した。DEAE・セルロース 200 ml を充填したカラムに通し、酵素を吸着せしめた。同様の緩衝液でカラムを洗浄後、緩衝液濃度を 0.1 M に上げて NAD(P)-CDH を溶出した。NAD(P)-CDH を含む画分を集め、これを濃縮後 20 mM リン酸緩衝液 PH 7.0 に対して透析した。これを同様の緩衝液で平衡化したヘキシルセファロース 20 ml を充填したカラムに通し、吸着せしめた。このカラムを 20 mM リン酸緩衝液 PH 7.0 で洗浄した。次に 0.5 M NaCl を含む同様の緩衝液 200 ml を入れた 500 ml 容坂ロフラスコに接種し、30°C で 24 時間振盪培養する。この種培養液をコレステロール 5 g/l、グルコース 2 g/l、肉エキス 5 g/l、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 g/l、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g/l、消泡剤 0.5 g/l の組成よりなる培地 (PH 7.2) 20 l を入れた 30 l 容ジャーファーメンターに接種し、30°C で通気、攪拌 (0.5 v/v/min、200 rpm) しながら、72 時間培養した。この培養液を遠心分離 (8000 rpm、10 分間) 除菌した。得られた培養液に、硫酸アンモニウムを 40 % 飽和になるように加え酵素を沈澱せしめた。沈澱を遠心分離 (8000 rpm、10 分間) で集め、20 mM リン酸緩衝液 PH 7.0、100 ml に溶かし、セロファンチューブで、20 mM リン酸緩衝液 PH 7.0 に対して 24 時間透析した。

次に実施例 1～実施例 3 に準ずる方法で精製を行ない、30 単位/ml の NAD(P)-CDH 溶液を 3.2 ml 得た。全体の活性収率は 32 % であった。

液で NAD(P)-CDH を溶出し、活性画分を集め、濃縮し、50 単位/ml の NAD(P)-CDH 溶液 5.0 ml を得た。全体の活性収率は 30 % であった。

## 実施例2

*Alcaligenes* sp. N<sub>2</sub>4 FERM-PN6216 をコレステロール 10 g/l、グリセロール 2 g/l、コンステープリカー 5 g/l、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 g/l、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g/l、消泡剤 0.5 g/l の組成よりなる培地に培養し、実施例 1 と同様の操作を行ない、40 単位/ml の NAD(P)-CDH 溶液を 5.0 ml 得た。全体の活性収率は 40 % であった。

## 実施例3

*Proteus vulgaris* IAM1025 を用い、実施例 1 に準ずる操作を行ない、37 単位/ml の NAD(P)-CDH 溶液 4 ml を得た。全体の活性収率は 52 % であった。

## 実施例4

*Nocardia* sp. N<sub>2</sub>Ch2-1 FERM-PN6217 をグルコース 5 g/l、肉エキス、酵母エキス 0.2 ml、少量の消泡剤の組成よりなる培地 (PH 7.2)

次に実施例 1～実施例 3 に準ずる方法で精製を行ない、30 単位/ml の NAD(P)-CDH 溶液を 3.2 ml 得た。全体の活性収率は 32 % であった。

次に実施例 1～実施例 3 に準ずる方法で精製を行ない、30 単位/ml の NAD(P)-CDH 溶液を 3.2 ml 得た。全体の活性収率は 32 % であった。

次に実施例 1～実施例 3 に準ずる方法で精製を行ない、30 単位/ml の NAD(P)-CDH 溶液を 3.2 ml 得た。全体の活性収率は 32 % であった。



## 実施例 5

*Alcaligenes* sp. №4 FERM-P№6216を用い、実施例4に準ずる操作を行ない、25単位/㎖のNAD(P)-CDH溶液を4.2 ㎖を得た。全体の活性収率は38%であった。

## 実施例 6

*Proteus vulgaris* IAM1025を用い、実施例4に準ずる操作を行ない、18単位/㎖のNAD(P)-CDH溶液を3.5 ㎖得た。全体の活性収率は49%であった。

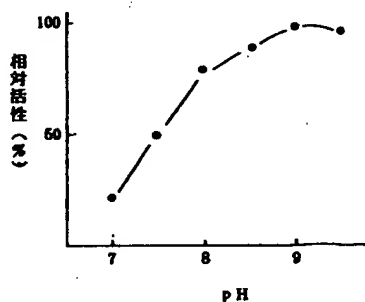
## 4 図面の簡単な説明

第1図はノカルジア sp. №Ch2-1 FERM-P№6217の生産するNAD(P)-CDHの30℃における至適PHを示す図であり、第2図は本NAD(P)-CDHの37℃におけるPH安定性を示す図であり、第3図は本NAD(P)-CDHの至適温度を示す図であり、第4図は本NAD(P)-CDHの熱安定性を示す図である。

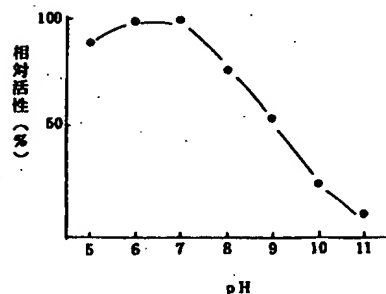
第5図はアルカリゲネス sp. №4 FERM-P№6216の生産するNAD(P)-CDHの30℃に

おける至適PHを示す図であり、第6図は本NAD(P)-CDHの37℃におけるPH安定性を示す図であり、第7図は本NAD(P)-CDHの至適温度を示す図であり、第8図は本NAD(P)-CDHの熱安定性を示す図である。

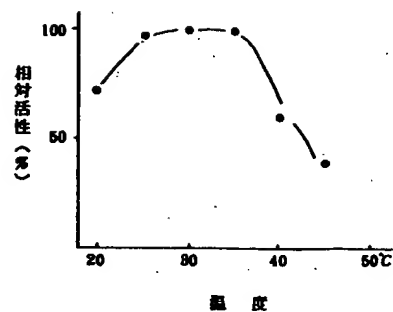
第1図



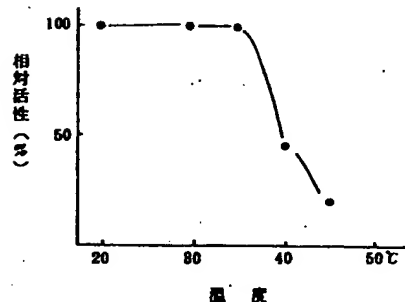
第2図



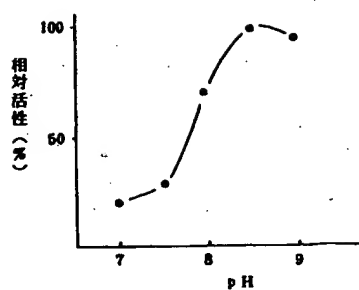
第3図



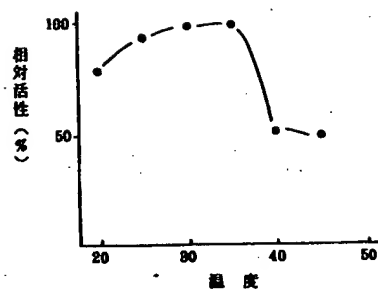
第4図



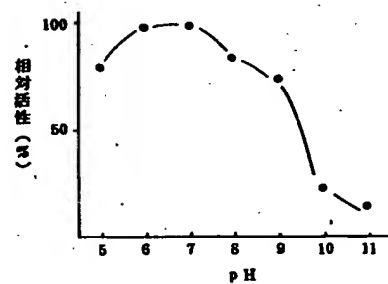
第5図



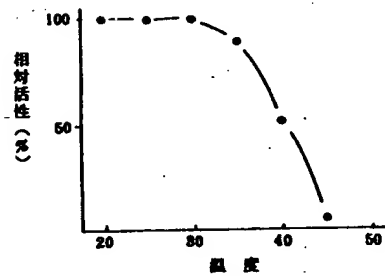
第7図



第6図



第8図



1/34/7 (Item 3 from file: 351)

003874561

WPI Acc No: 1984-020095/198404

**Measuring lipoprotein cholesterol level - by subjecting to electrophoresis then adding colouring agent contg. cholesterol esterase and dehydrogenase**

Patent Assignee: NIPPON CHEMIPHAR CO (NICM )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 58210000	A	19831207	JP 8292731	A	19820531	198404 B

Priority Applications (No Type Date): JP 8292731 A 19820531

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 58210000	A		3		

Abstract (Basic): JP 58210000 A

Sample is subjected to electrophoresis to fractionate lipoprotein cholesterol, and a colouring agent contg. cholesterol esterase (CE), cholesterol dehydrogenase (CDH) which is dependent upon NAD originated from anaerobes, NAD, diaphorase (DI) and NTB is contacted with the lipoprotein cholesterol.

The measurement of lipoprotein cholesterol level in serum is important for examination of diseases of coronary system, etc. Sharp and clear coloured pattern can be obt'd. in short time, and thus accurate measurement is possible. The colouring agent contains 10-15 microns of CE, 6-15 microns of CDH, 10-15 microns of DI, 10 -15 mMgof NAD and 0.5-1 mM of NTB. The colouring can be conducted by incubation of 35-38 deg.C for 20-40 minutes. The electrophoresis is conducted at 90V for 60-70 minutes.

0/0

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Additional): C12Q-001/60; G01N-027/26

SOURCE: (C) WPI / DERWENT

AP 2044526

AN : 84-020095 [04]

MC : B01-D02 B04-B02C B04-B02C2 B04-B03 B04-B04D B07-D13 B11-C07B B12-K04  
D05-A02

PN : JP58210000 A 831207 DW8404 003pp

PR : JP820092731 820531

PA : (NICM ) NIPPON CHEMIPHAR CO

DC : B04 D16

IC : C12Q1/60 ;G01N27/26

TI : Measuring lipoprotein cholesterol level - by subjecting to electrophoresis then adding colouring agent contg. cholesterol esterase and dehydrogenase

AB : J58210000 Sample is subjected to electrophoresis to fractionate lipoprotein cholesterol, and a colouring agent contg. cholesterol esterase (CE), cholesterol dehydrogenase (CDH) which is dependent upon NAD originated from anaerobes, NAD, diaphorase (DI) and NTB is contacted with the lipoprotein cholesterol.

- The measurement of lipoprotein cholesterol level in serum is important for examination of diseases of coronary system, etc. Sharp and clear coloured pattern can be obtd. in short time, and thus accurate measurement is possible. The colouring agent contains 10-15 microns of CE, 6-15 microns of CDH, 10-15 microns of DI, 10 -15 mMgof NAD and 0.5-1 mM of NTB. The colouring can be conducted by incubation of 35-38 deg.C for 20-40 minutes. The electrophoresis is conducted at 90V. for 60-70 minutes. (0/0)

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—210000

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 Q 1/60  
G 01 N 27/26  
33/92

識別記号

庁内整理番号  
8213—4B  
7363—2G  
8305—2G

④ 公開 昭和58年(1983)12月7日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 3 頁)

⑭ リポ蛋白質コレステロール濃度の測定方法

号日本ケミファ西ヶ原寮内

① 特 願 昭57—92731

② 出 願 昭57(1982)5月31日

③ 発 明 者 浦田武義

東京都北区西ヶ原2丁目29番3

① 出 願 人 日本ケミファ株式会社

東京都千代田区岩本町2丁目2  
番3号

④ 代 理 人 弁理士 有賀三幸 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

リポ蛋白質コレステロール濃度の測定方法

2. 特許請求の範囲

検体を電気泳動に付してリポ蛋白質コレステロールを分離した後、該リポ蛋白質コレステロールにコレステロールエステラーゼ、好気性微生物由来のNAD依存性コレステロールデヒドロゲナーゼ、NAD、ジアフオラーゼ及びNTBを含有する染色試薬を作用させて発色せしめることを特徴とするリポ蛋白質コレステロール濃度の測定方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はリポ蛋白質コレステロール濃度の測定方法に関する。

一般に、血清中のリポ蛋白質コレステロール、血清中高比重リポ蛋白質コレステロール(HDL-C)濃度の測定は、冠状動脈症等の疾患の成因や診断の場合に於て有用である。

而して、従来よりリポ蛋白質コレステロール濃度の測定法としては種々の方法が報告せられてい

るが、それぞれに難点があり、臨床上未だ充分満足し得るものはなかつた。

そこで、本発明者は斯かる従来の難点を解消し、信頼性の高い、臨床上有効な測定方法を提供すべく種々研究を重ねた結果、染色反応が速く、シャープで鮮明なパターンが得られる新規な染色試薬を開発し、本発明を完成したものである。

すなわち、本発明は検体を電気泳動に付してリポ蛋白質コレステロールを分離した後、該リポ蛋白質コレステロールにコレステロールエステラーゼ(以下CEと略称す)、好気性微生物由来のNAD依存性コレステロールデヒドロゲナーゼ(以下ODHと略称す)、NAD、ジアフオラーゼ(以下DIと略称す)及びNTBを含有する染色試薬を作用させて発色せしめることを特徴とするリポ蛋白質コレステロール濃度の測定方法である。

本発明を実施するには、まず血清等の体液を検体として電気泳動に付してリポ蛋白質コレステロールを分離する。而してここに電気泳動はリポ蛋

白質コレステロールを分離し得るものであれば、その具体的泳動法の如何を問わないが、例えば泳動用支持体としては薄層アガロースフィルムが、支持体緩衝液としてはバルビタール緩衝液が、泳動用緩衝液としてはトリシン-L1緩衝液が好適であり、泳動条件としてはアガロースフィルム-コーニングシステムで90V、60～70分間泳動で目的を達することができる。

次に、該電気泳動により分離せられたリポ蛋白質コレステロール、すなわち高比重リポ蛋白質コレステロール(HDL-C)、超低比重リポ蛋白質コレステロール(VLDL-C)、低比重リポ蛋白質コレステロール(LDL-C)に、OE、ODH、NAD、DI及びNTBを含有する染色試薬を作用させる。

ここに染色試薬は、例えば0.1MトリシンNa(pH7.6～9.6)3ml中、OE10～15u、ODH6～15u、DI10～15u、NAD10～15mM、NTB0.5～1mMを配合することによつて調製される。

により、HDL-C、VLDL-C、LDL-Cの各分画量を測定する。そして、常法により求めた総コレステロールに各量を乗じてHDL-C、VLDL-C及びLDL-Cの濃度を測定する。

以上の如く本発明は構成されるので、本発明方法を用いれば、迅速な染色反応により、シャープかつ鮮明なパターンを得ることができ、極めて正確なりポ蛋白質コレステロール濃度の測定を行い得るものである。しかも本発明によるときは非特異反応も全く認められず、臨床上極めて有利な測定法である。

以下実施例を挙げて本発明を更に説明する。

#### 実施例

##### (1) 電気泳動条件

泳動用支持体：薄層アガロースフィルム

支持体緩衝液：60mMバルビタール緩衝液

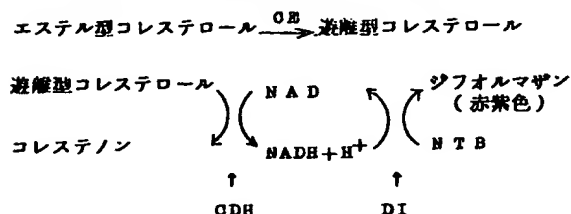
泳動用緩衝液：50mMトリシン-L1緩衝液(pH8.6)

泳動条件：アガロースフィルム-コーニングシステム、90V、70分間泳動

尚、本発明に用いられるODHは、前述の如く好気性微生物由来のNAD依存性のものであることが必須であるが、斯かるODHとしては天野製薬株式会社より提供されているものが好適である。

而して、斯かる染色試薬をリポ蛋白質コレステロールに作用させる方法としては所謂浸漬法、サンドイッチ法の何れをも採用し得るものであつて、通常35～38℃で20～40分間程度インキュベーションすることによつてリポ蛋白質コレステロールを発色せしめることができるものである。

この発色原理は次式の通りである。



次いで、斯かる発色反応を発色反応停止液(10%酢酸)を用いて停止せしめた後、精製水にて洗浄後乾燥し、濃度計(densitometer)等

##### (2) 試薬の調製

###### ① 染色試薬組成

0.1MトリシンNa(pH8.6)	3ml
OE	10u
ODH	6u
DI	10u
NAD	10mM
NTB	0.73mM

###### ② 染色反応停止液：10%酢酸

###### ③ 洗浄液：精製水

##### (3) 測定例

試料として血清3μlを上記電気泳動条件により電気泳動後、アガロースフィルムをセルから除去し、上記組成染色試薬3mlをゲル表面に均一に広げ、37℃で30分間反応させたところ、シャープな赤紫色のコレステロール分画が得られた。反応後10%酢酸に約1時間、次いで精製水に約1時間浸した後1.0g/mlグリセロールを含む3%酢酸中に約2分間浸した。

然る後、70℃で20分間ドライヤーにて乾燥

検、分画リポタンパク中のコレステロール分画を  
 を570 nmにてデンストメトリー (densitome-  
 try) し、HDL-C、VLDL-C、LDL-C  
 各々35%、5%、60%を得た。そして、常法  
 によつて得た総コレステロール値195 mg/dL  
 を乗じ、HDL-C: 68 mg/dL、VLDL-C:  
 10 mg/dL、LDL-C: 117 mg/dLを得た。

#### (4) 非特異反応

染色試薬からODHだけ抜いた血清プランク用  
 試液を作り、アガロースフィルムにて泳動した血  
 清分画面上及びアガロースフィルム全面に対する非  
 特異反応を検討したところ何ら非特異反応を認め  
 なかつた。

以 上

出願人 日本ケミファ株式会社

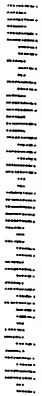
代理人 弁護士 有 賀 三 幸

弁護士 高 野 登志雄

弁護士 小 野 信 夫



TO: 1400 DFMSFN



P.O. BOX 1450  
ALEXANDRIA, VA 22313-1450  
IF UNDELIVERABLE RETURN IN TEN DAYS

OFFICIAL BUSINESS

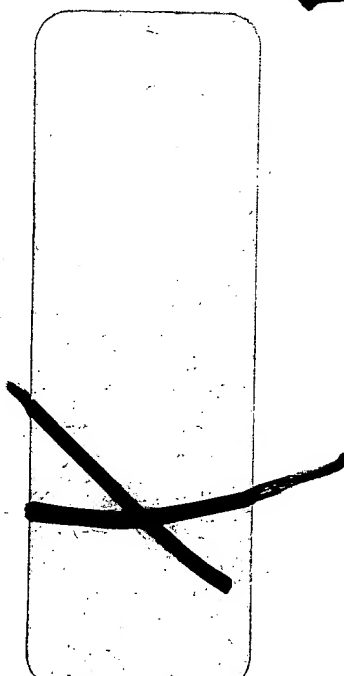
AN EQUAL OPPORTUNITY EMPLOYER



U.S. OFFICIAL MAIL  
PENALTY FOR  
PRIVATE USE \$300  
02 1A  
0004205065 APR 07 2006  
MAILED FROM ZIP CODE 22314

UNDELIVERABLE AS  
ADVISED  
FORWARDED ORDER  
EXPIRED

UNDELIVERABLE AS  
ADVISED  
FORWARDED ORDER  
EXPIRED



Feedback

RECEIVED  
APR 17 2006  
USPTO MAIL CENTER